

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. Dezember 2003 (18.12.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/104809 A1(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/543,  
33/548KOLZAU, Thomas [DE/DE]; Rehdersweg 24, 22399  
Hamburg (DE). KÖPPEN, Barbara [DE/DE]; Alpen-  
rosenweg 76, 22523 Hamburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/05909

(74) Anwalt: EMMEL, Thomas; Schaefer & Emmel,  
Gehölzweg 20, 22043 Hamburg (DE).(22) Internationales Anmeldedatum:  
5. Juni 2003 (05.06.2003)

(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,  
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,  
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 25 501.6 10. Juni 2002 (10.06.2002) DE

## Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): EPPENDORF AG [DE/DE]; Barkhausenweg 1,  
22339 Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PAPRA, Alexander  
[DE/DE]; Max Herz Ring 271, 22159 Hamburg (DE).Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: SOLID PHASE SUBSTRATE FOR IMMOBILIZING BIOMOLECULES

(54) Bezeichnung: FESTPHASENSUBSTRAT ZUR IMMOBILISIERUNG VON BIOMOLEKÜLEN

(57) Abstract: The invention relates to a solid phase substrate comprising at least one binding area, which is suited for immobilizing biomolecules. The solid phase substrate is characterized in that the substrate has, in the binding area, reactive binding sites at which polyol prefabricated by means of covalent bonds is immobilized.

(57) Zusammenfassung: Ein Festphasensubstrat mit mindestens einem Bindungsbereich, der zur Immobilisierung von Biomolekülen geeignet ist, ist dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat im Bindungsbereich reaktive Bindungsstellen aufweist, an denen Polyol vorkonfektioniert mittels kovalenter Bindungen immobilisiert ist.

WO 03/104809 A1

## Festphasensubstrat zur Immobilisierung von Biomolekülen

---

Die Erfindung bezieht sich auf ein Festphasensubstrat zur Immobilisierung von Biomolekülen nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1 sowie auf ein Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen in einer Probe nach dem Oberbegriff des Anspruchs 8.

Die Immobilisierung von Biomolekülen an Festphasensubstraten ist z.B. erforderlich bei der Herstellung von Arrays, z.B. Protein-Arrays, Enzymmembranen, mit Proteinen beschichteten Reaktionsgefäßen etc.

Gattungsgemäße insbesondere für Enzymmembranen geeignete Festphasensubstrate bestehen z.B. aus Nitrozellulose, die aufgrund ihres geringen Preises, ihrer Flexibilität und ihrer guten Bindungseigenschaften insbesondere für Proteine verwendet wird. Die für die Bindungseigenschaften von Nitrozellulose gegenüber Biomolekülen verantwortlichen Mechanismen sind unbekannt. Sie beruhen

jedoch vermutlich auf der Bildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen sowie auf hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen. Die Adsorption erfolgt in der Praxis z.B. durch einfache Inkubation des Substrats in einer Biomoleküle enthaltende Lösung und anschließende Trocknung.

Dabei ist es bekannt (Nguyen VK et al. 1998, Stabilization of dry immobilized acetylcholinesterase on nitrocellulose membrane for rapid colorimetric screening of its inhibitors in water and biological fluids, Analytical letters 31(14), 2457), die Biomoleküle in Anwesenheit von Polyolen wie z.B. Trehalose zu immobilisieren, um eine Denaturierung der Biomoleküle während der Trocknung zu verhindern. Ziel ist, die an dem Substrat immobilisierten Biomoleküle weitestgehend in ihrer natürlichen Konformation zu erhalten, dergestalt, daß z.B. immobilisierte Enzyme ihre katalytische Aktivität beibehalten oder Antikörper ihre spezifischen immunologischen Eigenschaften bewahren. Die im jeweiligen Falle verwendeten Polyole werden auch als Schutzsubstanzen bezeichnet.

Dabei können die Polyole sowohl gleichzeitig mit als auch nach den zu immobilisierenden Biomolekülen auf die Nitrozellulosemembran adsorbiert werden. Da Polyole mit Ihren OH-Gruppen ähnliche funktionelle Gruppen aufweisen wie viele Biomoleküle (z.B. die alkoholischen Aminosäuren Tyrosin und Serin), kann angenommen werden, daß sie ähnlich wie die Biomoleküle auf der Oberfläche der Nitrozellulosemembran unspezifisch adsorbieren.

Ein Nachteil bei diesen gattungsgemäßen Substraten ist, daß die auf dem Substrat adsorbierten, nicht kovalent gebundenen Polyole bei der späteren Verwendung des Substrats in Lösung gehen und den anschließenden Versuch beeinträchtigen können. Es ist daher in der Regel erforderlich, das getrocknete Substrat vor einer weiteren Anwendung bzw. Aufarbeitung sorgfältig zu waschen.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Substrat und ein Verfahren zu schaffen, mit denen sich dem oben beschriebenen Nachteil begegnen läßt.

Gelöst wird die Aufgabe mit einem Festphasensubstrat mit einem Bindungsbereich, der zur Immobilisierung von Biomolekülen geeignet ist, wobei das Substrat die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 1 aufweist, sowie mit einem Verfahren, das die kennzeichnenden Merkmale des Anspruches 8 aufweist.

Das erfindungsgemäße Festphasensubstrat weist gemäß Anspruch 1 im Bindungsbereich reaktive Bindungsstellen auf, wobei an einem Teil davon Polyole vorkonfektioniert mittels kovalenter Bindungen immobilisiert sind. Geeignete Substrate können z.B. aus Kunststoff aber natürlich auch aus Glas bestehen. In der Regel handelt es sich um flächige Substrate, z.B. Slides oder Objektträger. Denkbar sind selbstverständlich auch andere Substrate z.B. die Wände von Reaktionsgefäßen oder dergleichen. Grundsätzlich sollen alle im Rahmen der hier angesprochenen Immobilisierung von Biomolekülen sinnvolle Substrate durch die Erfindung abgedeckt werden.

Bei Verwendung des erfindungsgemäßen Substrates erübrigt sich die bei gattungsgemäßen Substraten erforderliche separate Adsorption des Polyols. Es müssen also während des gesamten weiteren Verarbeitungsprozesses keine Polyole mehr zugegeben werden. Überdies muß das Substrat vor einer weiteren Verwendung nicht gewaschen werden, da das vorliegende Polyol kovalent gebunden und nicht nur adsorbiert ist, und daher eine Beeinträchtigung eines anschließenden Versuchs durch in Lösung gehende Polyole nicht zu befürchten ist. Ein solches, vorkonfektioniert mit kovalent gebundenen Polyolen beschichtetes Festphasensubstrat eignet sich insbesondere für das Besspotten mit Protein- oder Nukleinsäu-

resonden bzw. -proben, und ist daher besonders gut für die Herstellung von Bioarrays geeignet.

In einer bevorzugten Ausgestaltung ist vorgesehen, daß der Bindungsbereich zur Immobilisierung von Proteinen ausgelegt ist. Die reaktiven Bindungsstellen im Bindungsbereich müssen daher für die kovalente Bindung von Proteinen geeignete funktionelle Gruppen aufweisen. Diese können z.B. esteraktiv sein, so daß sie mit Aminogruppen kovalente Bindungen eingehen können. Denkbar sind selbstverständlich auch andere Bindungsstellen. Unter Bindungsstellen sollen im Rahmen der Erfindung im wesentlichen im Bindungsbereich an das Substrat gekoppelte funktionelle Gruppen verstanden werden, die in der Lage sind mit den jeweiligen Biomolekülen und den Polyolen eine Bindung einzugehen.

In weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsformen kann der Bindungsbereich so ausgelegt sein, daß er sich zur Bindung anderer Biomoleküle, wie z.B. Zucker, Lipide oder Nukleinsäuren eignet. Hierfür eignen sich die üblichen dem Fachmann bekannten Bindungsstellen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung weist das Substrat an seine Oberfläche gekoppelte Polymerketten auf. Dabei ist vorgesehen, daß die an dem Substrat angeordneten Polymerketten die erforderlichen reaktiven Bindungsstellen zur Kopplung der Biomoleküle tragen. In diesem Fall sind an den Polymerketten ebenfalls die zur Stabilisierung der immobilisierten Biomoleküle erforderlichen Polyole gebunden.

Die Polymerketten können unvernetzt mit jeweils ihrem einen Ende an die Oberfläche des Substrats gekoppelt sein und mit dem anderen Ende davon abstehen. Denkbar sind aber auch Vernetzungen der Polymere untereinander in unter-

schiedlichen Graden, bis hin zu einem Hydrogel. Die Verwendung solcher Polymerketten erhöht die aktive Oberfläche des Substrats und gestattet so die Bindung einer größeren Menge von Polyolen und/oder Biomolekülen.

In einer bevorzugten Ausgestaltung ist außerdem vorgesehen, daß in den Polymerketten Polyethylenglykol gebunden ist. Solche PEG-enthaltenden Polymere schirmen die Substratoberfläche z.B. gegen unspezifische, nicht kovalente Absorption anderer Proteine ab.

Bei der Herstellung der vorkonfektionierten Substrate können im Rahmen der Erfindung Polyole, z.B. Mono-, Di- oder Trisaccharide als Schutzsubstanzen eingesetzt werden. Geeignet sind z.B. Maltose, Saccharose, Raffinose oder Glukose. Grundsätzlich sind alle Substanzen geeignet, die über OH-Gruppen an eine aktivierte Oberfläche eines Substrats gekoppelt werden können und die in der Lage sind, die dreidimensionale Konformation von Biomolekülen, z.B. Proteinen zu stabilisieren. Ein besonders bevorzugt eingesetztes Polyol ist Trehalose.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, daß das Festphasensubstrat ein Biochip, ein Enzymchip, ein Proteinarray, eine Filtermembran, ein Microbead, ein Reaktionsgefäß, ein Mikrokanalsystem, ein Durchflußschlauchsystem, eine Pipettenspitze oder eine Durchflußkanüle ist.

Die Erfindung soll jedoch auch Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen umfassen.

Das erfindungsgemäße Verfahren sieht gemäß Anspruch 8 vor, daß eine Probe in Kontakt mit einem Festphasensubstrat gebracht wird, das mindestens einen Bindungsbereich aufweist, der zur Immobilisierung von Biomolekülen geeignet ist, und bei dem die Immobilisierung in Gegenwart einer Substanz erfolgt, die in der

Lage ist, die dreidimensionale Konformation der Biomoleküle zu stabilisieren, wobei das Substrat im Bindungsbereich reaktive Bindungsstellen aufweist und als Substanz Polyole eingesetzt werden, die im Bindungsbereich des Festphasensubstrats mittels kovalenter Bindungen an einen Teil der Bindungsstellen gebunden werden.

In einer bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen, daß es sich bei den zu immobilisierenden Biomolekülen um Proteine handelt. Die reaktiven Bindungsstellen im Bindungsbereich müssen daher für die kovalente Bindung von Proteinen geeignete funktionelle Gruppen aufweisen.

In weiteren erfindungsgemäßen Ausgestaltungen kann jedoch auch vorgesehen sein, daß es sich bei den zu immobilisierenden Biomolekülen z.B. um Zucker, Lipide oder Nukleinsäuren handelt. Die reaktiven Bindungsstellen im Bindungsbereich können die jeweils für diese Fälle geeigneten, dem Fachmann bekannten, funktionellen Gruppen aufweisen.

Bekannte Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen, bei denen als Biomoleküle beispielsweise Proteine verwendet werden, umfassen im wesentlichen folgende Schritte:

1. Eine proteinhaltige Lösung wird in Kontakt mit einem aktivierten Substrat gebracht. Bei dem Substrat kann es sich z.B. um ein Filter, eine Membran, ein Chip, ein Reaktionsgefäß handeln, um nur einige übliche Einrichtungen aufzuzählen.

Übliche Substrate weisen reaktive Bindungsstellen auf, die mit funktionellen Gruppen der zu bindenden Proteine kovalente Bindungen eingehen können. Bei Kontakt mit dem Substrat werden die Proteine kovalent an die

reaktiven Bindungsstellen gebunden und auf diese Weise an dem Substrat immobilisiert.

2. Das Substrat wird dann ggf. gewaschen.
3. In einem nächsten Schritt werden die Bindungsstellen auf dem Substrat durch z.B. Zugabe eines starken nucleophilen Agens, z.B. eines kurzkettigen Amins, blockiert.
4. Es wird dann erneut gewaschen, wobei dieser letzte Waschpuffer eine hohe Konzentration einer Schutzsubstanz enthält, die in der Lage ist, die dreidimensionale Konformation von Proteinen zu stabilisieren. In bekannten Verfahren ist diese Substanz z.B. das Polyol Trehalose.
5. Das Substrat wird dann in üblicher Weise getrocknet, wobei die Trehalose aus dem Waschpuffer auf das Substrat adsorbiert wird.

Im Gegensatz zu diesen Verfahren aus dem Stand der Technik entfallen bei dem erfindungsgemäßen Verfahren der Blockierungsschritt mit einem starken nucleophilen Agens und der letzte Waschschrift, bei dem ein Polyol auf das Substrat adsorbiert wird. Anders als im Stand der Technik wird das Polyol bei dem erfindungsgemäßen Verfahren überdies nicht auf die Substratoberfläche adsorbiert, sondern geht mit dieser Oberfläche genau wie die Biomoleküle eine kovalente Bindung ein.

Die kovalente Immobilisierung der Polyole auf dem Substrat hat keinen nachteiligen Einfluß auf ihre Funktion als Schutzsubstanz für die Biomoleküle. Wesentlicher Vorteil und Unterschied gegenüber den bereits bekannten Verfahren ist jedoch, daß die Polyole aufgrund ihrer festen Kopplung an dem Substrat eine



spätere Anwendung nicht mehr stören. Vor einer Aufarbeitung des Substrates mit den daran immobilisierten Biomolekülen muß also kein aufwändiger Waschschritt mehr vorgesehen werden.

In einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, daß die Polyole kovalent über im Bindungsbereich angeordnete Polymerketten, die die reaktiven Bindungsstellen tragen, am Festphasensubstrat gebunden werden. Die Verwendung solcher Polymerketten erhöht die aktive Oberfläche des Substrats und gestattet so die Bindung von mehr Polyolen und/oder Biomolekülen.

Besonders bevorzugt werden die Polyole und die Biomoleküle gleichzeitig am Festphasensubstrat gebunden. Am einfachsten läßt sich dies erreichen, indem man z.B. eine zur Immobilisierung eingesetzte Proteinlösung mit dem Polyol versetzt. In Abhängigkeit von der eingesetzten Polyolkonzentration kommt es dann zu einer entsprechenden anteiligen Kopplung der Bindungsstellen mit der Polyolen und den Biomolekülen bzw. Proteinen.

In einer Lösung, die als Biomoleküle z.B. Proteine enthält, liegen geeignete Polyolkonzentrationen zwischen 1 und 100 g/l. Besonders geeignet sind Polyolkonzentrationen zwischen 5 und 50 g/l.

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen, daß das eingesetzte Festphasensubstrat bereits vorkonfektioniert gebundene Polyole enthält.

Ein solches, vorkonfektioniert mit kovalent gebundenen Polyolen ausgestattetes Festphasensubstrat eignet sich insbesondere für das Bepottern mit Protein- oder Nukleinsäuresonden bzw. -proben. Mögliche Anwendungsbereiche sind z.B. die

großserienhafte Herstellung von standardisierten Bioarrays, bei denen die immobilisierten Biomoleküle während der Lagerung der Bioarrays bis zu deren Benutzung vor Denaturierung geschützt werden müssen.

In einer bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen, daß das Festphasensubstrat, nachdem es mit der Probe in Kontakt gebracht wurde, getrocknet wird. In dieser Ausgestaltung kommt der schützende Effekt der als Schutzsubstanz verwendeten Polyole besonders zum Tragen, da die Trocknung eines mit Biomolekülen beschichteten Substrats, das keine Polyole aufweist, in der Regel zur Denaturierung der Biomoleküle führt.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen daß die Polymerketten im Bindungsbereich zusätzlich PEG aufweisen. Solche PEG-enthaltenen Polymere schirmen die Substratoberfläche z.B. gegen unspezifische Absorptionen anderer Biomoleküle ab.

Im Rahmen der Erfindung einsetzbare Polyole können z.B. Mono-, Di- oder Trisaccharide sein. Geeignet sind z.B. Maltose, Saccharose, Raffinose, Galaktose oder Glukose. Die obigen Aufzählungen sind nur beispielhaft und keinesfalls abschließend. Grundsätzlich sind alle Substanzen geeignet, die über geeignete funktionelle Gruppen, wie z.B. OH-Gruppen, an eine aktivierte Oberfläche eines Substrats gekoppelt werden können und die in der Lage sind, die dreidimensionale Konformation von Biomolekülen, insbesondere von Proteinen, zu stabilisieren. Besonders bevorzugt wird das Polyol Trehalose eingesetzt, das, wie Untersuchungen der Anmelderin ergeben haben, die auf dem Substrat immobilisierten Biomoleküle sehr wirksam stabilisiert.

In einer bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen, daß das Festphasensubstrat ein Biochip, ein Enzymchip, ein Proteinarray, eine Filtermembran,

ein Microbead, ein Reaktionsgefäß, ein Mikrokanalsystem, ein Durchflußschlauchsystem, eine Pipettenspitze oder eine Durchflußkanüle ist.

Einige der erfindungsgemäß eingesetzten Substrate können generell nach der z.B. von Ulbricht et al. in Colloids and Surfaces Vol. 138, 1998, S. 353, beschriebenen in-situ-Technik mittels Photo-initiiertes-Pfropf-Polymerisation hergestellt werden.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Substrate werden bei der erwähnten Methode Monomere, an die Polyole gebunden sind, mit Monomeren, die die Bindungsstellen für die Proteine, z.B. esteraktive Gruppen, aufweisen copolymerisiert. Durch Einstellung der Ausgangskonzentrationen der unterschiedlichen Monomere kann man ein gewünschtes Verhältnis zwischen Polyol- und Proteinbindungsstellen in den Polymeren auf besonders einfache Weise einstellen. Denkbar ist natürlich, daß man noch weitere Monomere mit anderen Gruppen in die Polymere einpolymerisiert. Z.B. könnte man Monomere copolymerisieren, die PEG enthalten.

Im folgenden soll die Erfindung anhand von einem Beispiel näher erläutert werden. Das Beispiel betrifft ein im Rahmen der Erfindung durchführbares Protokoll, bei dem ein Protein und Trehalose gleichzeitig mit dem Substrat in Kontakt gebracht werden.

Beispiel: Immobilisierung von Trypsin an carboxylierte Nylonmembranen

Um mit aktivem Trypsin beschichtete Membranen zu erhalten, wie sie z.B. in der "Double Parallel Digestion"-Methode (Bienvenut et al. in Anal Chem Vol. 71, 1999, S. 4800-4807) zur Proteinidentifikation benutzt werden, und die darüber hinaus trockenbar sein sollen, wird wie folgt vorgegangen:

Verwendete Abkürzungen:

PP: Phosphatpuffer (0,1M, pH 4,8)

PVDF: Polyvinylidenfluorid

EDC: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

NHS: N-Hydroxysuccinimid

PBS: Phosphatgepufferte physiologische Salzlösung (pH 7,4)

Triton X: nichtionisches Detergens

Tween: nichtionisches Detergens

1. Eine carboxylierte PVDF-Membran (Millipore, Inc.) mit einer mittleren Porengröße von  $0,45\mu\text{m}$  wird 10 min mit PP inkubiert und sodann mit in PP gelöstem EDC (25mg/ml) sowie in PP gelöstem NHS (10mg/ml) im Verhältnis 1 : 1 für 12 min aktiviert.
2. Anschließend wird die aktivierte Membran mit PP gewaschen, und für 120 min mit einer PP-Lösung inkubiert, die Trypsin ( $2\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ ) sowie Trehalose (50g/l) enthält. Anschließend wird mit PP gewaschen.
3. Die Membran wird dann mit  $20\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  Methoxyethylamin für 10 min inkubiert, um Trypsin und Trehalose kovalent an die Membran zu binden.
4. Anschließend wird 3x mit PP, der 0,05% Triton X enthält, gewaschen, und mit PBS/Tween für 10 min inkubiert.
5. Die letzte Lösung wird dann entfernt und die Membran getrocknet.

Die nach dieser Methode mit aktivem Trypsin beladene Membran ist im trockenen Zustand lagerstabil und kann auf einfache Weise transportiert oder verschickt werden.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Festphasensubstrat mit mindestens einem Bindungsbereich, der zur Immobilisierung von Biomolekülen geeignet ist, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Substrat im Bindungsbereich reaktive Bindungsstellen aufweist, wobei an einem Teil dieser Bindungsstellen Polyol vorkonfektioniert mittels kovalenter Bindungen immobilisiert ist.
2. Festphasensubstrat gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Bindungsbereich zur Immobilisierung von Proteinen ausgelegt ist.
3. Festphasensubstrat gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß im Bindungsbereich Polymerketten angeordnet sind, die die reaktiven Bindungsstellen tragen.

4. Festphasensubstrat gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß in den Polymerketten zusätzlich PEG gebunden ist.
5. Festphasensubstrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das eingesetzte Polyol ein Mono-, Di- oder Trisaccharid ist.
6. Festphasensubstrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das eingesetzte Polyol Trehalose ist.
7. Festphasensubstrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Festphasensubstrat ein Biochip, ein Enzymchip, ein Proteinarray, eine Filtermembran, ein Microbead, ein Reaktionsgefäß, ein Mikrokanalsystem, ein Durchflußschlauchsystem, eine Pipettenspitze oder eine Durchflußkanüle ist.
8. Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen in einer Probe, bei dem die Probe in Kontakt mit einem Festphasensubstrat gebracht wird, das mindestens einen Bindungsbereich aufweist, der zur Immobilisierung von Biomolekülen geeignet ist, und bei dem die Immobilisierung in Gegenwart einer Substanz erfolgt, die in der Lage ist, die dreidimensionale Konformation der Biomoleküle zu stabilisieren, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Substrat im Bindungsbereich reaktive Bindungsstellen aufweist, als Substanz Polyole eingesetzt werden, und die Polyole während des Verfahrens an einen Teil der Bindungsstellen kovalent gebunden werden.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei den Biomolekülen um Proteine handelt.

10. Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Polyole kovalent über im Bindungsbereich angeordnete Polymerketten, die die reaktiven Bindungsstellen tragen, am Festphasensubstrat gebunden werden.
11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 - 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß Polyole und Biomoleküle gleichzeitig am Festphasensubstrat gebunden werden.
12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 - 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Festphasensubstrat eingesetzt wird, das bereits vorkonfektioniert gebundene Polyole enthält.
13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 - 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Festphasensubstrat, nachdem es mit der Probe in Kontakt gebracht wurde, getrocknet wird.
14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 - 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Polymerketten im Bindungsbereich zusätzlich PEG aufweisen.
15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 - 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß das eingesetzte Polyol ein Mono-, Di- oder Trisaccharid ist.
16. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 - 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß das eingesetzte Polyol Trehalose ist.
17. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 - 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Festphasensubstrat ein Biochip, ein Enzymchip, ein Proteinarray, eine Filtermembran, ein Microbead, ein Reaktionsgefäß, ein Mikrokanalys-



stem, ein Durchflußschlauchsystem, eine Pipettenspitze oder eine Durchflußkanüle ist.

18. Verwendung eines Festphasensubstrats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 als Slide zum Spotten von Biomolekülen.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/05909

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/543 G01N33/548

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 196 536 A (NGO THAT T ET AL) 23 March 1993 (1993-03-23) the whole document ---	1-17
X	US 5 624 831 A (VU KHUE NGUYEN ET AL) 29 April 1997 (1997-04-29) the whole document ---	1-17
X	US 5 403 750 A (BRAATZ JAMES A ET AL) 4 April 1995 (1995-04-04) the whole document --- -/--	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 October 2003

Date of mailing of the international search report

10/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Herrmann, K

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CORDONE LORENZO ET AL: "A reduction of protein specific motion in co-ligated myoglobin embedded in a trehalose glass" EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL, vol. 27, no. 2, 1998, pages 173-176, XP002258298 ISSN: 0175-7571 the whole document	1-18
A	NGUYEN VU KHUE ET AL: "Stabilization of dry immobilized acetylcholinesterase on nitrocellulose membrane for rapid colorimetric screening of its inhibitors in water biological fluids" ANALYTICAL LETTERS, vol. 31, no. 14, November 1998 (1998-11), pages 2457-2473, XP009019271 ISSN: 0003-2719 cited in the application the whole document	1-18
E	WO 03 050276 A (DOW GLOBAL TECHNOLOGIES INC) 19 June 2003 (2003-06-19) the whole document	1-18

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

/EP 03/05909

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5196536	A	23-03-1993	US 5130436 A	14-07-1992
US 5624831	A	29-04-1997	BE 1008221 A3 EP 0675197 A1	20-02-1996 04-10-1995
US 5403750	A	04-04-1995	US 5169720 A CA 2061510 A1 DE 69205199 D1 DE 69205199 T2 EP 0510393 A1 JP 7191008 A CA 2061664 A1 EP 0502591 A2 JP 5103831 A	08-12-1992 07-09-1992 09-11-1995 07-03-1996 28-10-1992 28-07-1995 07-09-1992 09-09-1992 27-04-1993
WO 03050276	A	19-06-2003	WO 03050276 A1 WO 03050234 A2 US 2003134294 A1	19-06-2003 19-06-2003 17-07-2003

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 G01N33/543 G01N33/548

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	US 5 196 536 A (NGO THAT T ET AL) 23. März 1993 (1993-03-23) das ganze Dokument	1-17
X	US 5 624 831 A (VU KHUE NGUYEN ET AL) 29. April 1997 (1997-04-29) das ganze Dokument	1-17
X	US 5 403 750 A (BRAATZ JAMES A ET AL) 4. April 1995 (1995-04-04) das ganze Dokument	1-17
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Oktober 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10/11/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Herrmann, K

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	CORDONE LORENZO ET AL: "A reduction of protein specific motion in co-ligated myoglobin embedded in a trehalose glass" EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL, Bd. 27, Nr. 2, 1998, Seiten 173-176, XP002258298 ISSN: 0175-7571 das ganze Dokument ----	1-18
A	NGUYEN VU KHUE ET AL: "Stabilization of dry immobilized acetylcholinesterase on nitrocellulose membrane for rapid colorimetric screening of its inhibitors in water biological fluids" ANALYTICAL LETTERS, Bd. 31, Nr. 14, November 1998 (1998-11), Seiten 2457-2473, XP009019271 ISSN: 0003-2719 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	1-18
E	WO 03 050276 A (DOW GLOBAL TECHNOLOGIES INC) 19. Juni 2003 (2003-06-19) das ganze Dokument -----	1-18

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung und zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

EP 03/05909

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5196536	A	23-03-1993	US	5130436 A	14-07-1992
US 5624831	A	29-04-1997	BE	1008221 A3	20-02-1996
			EP	0675197 A1	04-10-1995
US 5403750	A	04-04-1995	US	5169720 A	08-12-1992
			CA	2061510 A1	07-09-1992
			DE	69205199 D1	09-11-1995
			DE	69205199 T2	07-03-1996
			EP	0510393 A1	28-10-1992
			JP	7191008 A	28-07-1995
			CA	2061664 A1	07-09-1992
			EP	0502591 A2	09-09-1992
			JP	5103831 A	27-04-1993
WO 03050276	A	19-06-2003	WO	03050276 A1	19-06-2003
			WO	03050234 A2	19-06-2003
			US	2003134294 A1	17-07-2003